

200911002A

厚生労働科学研究費補助金  
創薬基盤推進研究事業

非ヒト霊長類造血器腫瘍モデル作出と悪性腫瘍モデル作出に向けた  
基盤技術の開発に関する研究(H19-生物資源-一般-002)

平成 21 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 九州大学・生体防御医学研究所  
ゲノム病態学分野  
教授 谷 憲三朗

平成 22 (2010) 年 5 月

## 目 次

|   |          |
|---|----------|
| I. 総括研究報告   |          |
| 非ヒト霊長類造血器腫瘍モデル作出と<br>悪性腫瘍モデル作出に向けた基盤技術<br>の開発に関する研究                     | ----- 1  |
| 谷 憲三朗   |          |
| II. 分担研究報告  |          |
| 1. 小型霊長類コモンマーモセット白血病<br>モデル作出に関する研究                                     | ----- 6  |
| 谷 憲三朗   |          |
| 2. コモンマーモセット ATLL モデル<br>作出に関する研究                                       | ----- 9  |
| 小林 誠一郎  |          |
| 3. 小型霊長類コモンマーモセット白血病<br>モデル作出に関する研究：<br>コモンマーモセットの造血幹・前駆細胞<br>の単離に関する研究 | ----- 11 |
| 佐々木 えりか   |          |
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表   | ----- 13 |
| IV. 研究成果の刊行物・別刷   | ----- 15 |

非ヒト霊長類造血器腫瘍モデル作出と悪性腫瘍モデル作出に向けた基盤技術の開発に関する研究

主任研究者 谷 憲三朗 九州大学生体防御医学研究所・ゲノム病態学分野 教授

#### 研究要旨

コモンマーモセットに成人T細胞性白血病・リンパ腫(ATLL)モデル作出を最終目的に、コモンマーモセット個体にHTLV-1産生細胞株：MT-2細胞を、腹腔内および経静脈的に投与した。腹腔内投与個体において1年間以上にわたりHTLV-1抗体価の上昇とプロウイルスの検出を認めており、キャリア状態を作出できた。今後免疫抑制剤を投与することでのATLL発症の有無を検討する。次に白血病（急性リンパ性白血病）モデルを作出することを目的に、レンチウイルスベクターを用いたp190 bcr/abl遺伝子導入自家末梢血幹細胞移植ならびに骨髄内への同レンチウイルスベクター直接注入を行い、後者において持続的にコモンマーモセット末梢血ならびに骨髄細胞内にp190遺伝子発現を認めた。しかし、その後p190遺伝子は検出できなくなり現在に至っている。白血病発症を加速させるべく、免疫抑制剤の投与やp190以外の付加的な遺伝子の投与等を検討している。コモンマーモセット造血および免疫系細胞をより科学的に同定・解析することはコモンマーモセット白血病ならびにATLLモデルの解析上きわめて重要となるため、コモンマーモセット単クローン抗体を作製するとともに、その特性を検討した。また、これらの研究に供するためのコモンマーモセット骨髄細胞の供給支援体制を確立した。さらに、遺伝子ノックイン法を用いてコモンマーモセットに悪性腫瘍モデルを作出することを目的に、コモンマーモセットp53ゲノム解析とそれを基にZinc finger nucleaseを設計・構築し、現在その細胞への効果を検討中である。

#### 分担研究者

谷憲三朗 九州大学生体防御医学研究所・教授  
小林誠一郎 東京大学医科学研究所・助教  
佐々木えりか 実験動物中央研究所・室長

#### A. 研究目的

1. 成人T細胞性白血病・リンパ腫(ATLL)は、HTLV-1ウイルスの感染後、長期間のキャリア状態を経て発症する予後不良の造血期悪性腫瘍である。マウス、ラットのATLLモデルはすでに報告されているが、ヒトと遺伝学的背景がより近い霊長類のモデルはまだ確立されていない。本研究では、その作出を目的とする。
2. Ph(フィラデルフィア)染色体陽性成人急性リンパ性白血病は、9番染色体と22番染色体の長腕間相互転座t(9;22)(q34;q11)(Ph染色体)から生じるp190 bcr/abl遺伝子を主病因とする予後不良の造血期悪性腫瘍である。この霊長類モデルは未だなく、本研究ではその作出を目的とする。
3. コモンマーモセットの造血幹・前駆細胞移植や造血器腫瘍解析に有用な抗マーモセット血球単クローン抗体の作製を行った。またこれら研究に供するマーモセット骨髄細胞供給の問題点についても検討を加えた。
4. 悪性腫瘍を含む種々の疾患モデルコモンマーモセット作出を最終目的に、ES細胞を用いたノックイン法による悪性腫瘍モデル作出技術の開発が可能と考えられる新技術であるZFPヌクレアーゼ法を用いた悪性腫瘍高発症コモンマーモセットモデル作出に向けた基礎研究を実施する。

#### B. 研究方法

1. ATLLモデル：HTLV-1産生MT-2細胞株を経静脈あるいは経腹腔内に霊長類であるコモンマーモセットに投与し、経時的に採血を行い、HTLV-1抗体価、HTLV-1プロウイルス量、末梢血スメアを経時的に観察した。

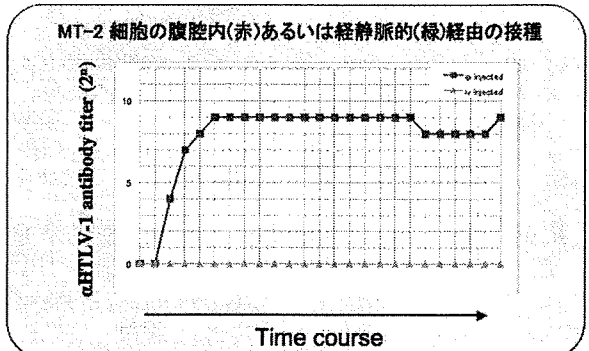
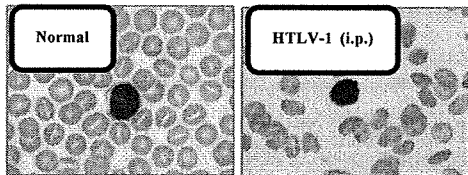
2. Ph染色体陽性ALLモデル：p190遺伝子をin vitroでコモンマーモセットの末梢血単核球細胞導入後、ブスルファン前処置後に自家移植した。あるいは5-Fluorouracilを大腿静脈内に投与後プレドニゾン投与による免疫抑制を行い左右両膝関節の1cm直上から大腿骨髄内にp190遺伝子発現レンチウイルスベクターを骨髄内に注入した。各個体においてp190 bcr-abl mRNA / DNAをRT-PCR法 / PCR法を用いて検出した。
3. 抗マーモセットCD抗原単クローン抗体の作製：抗マーモセットCD抗原単クローン抗体の作製にはコモンマーモセット抗原cDNAおよびcDNA発現CHO(chinese hamster ovary)細胞をBALB/cマウスにSongらの方法で免疫をしたのち、標準法にしたがいハイブリドーマ細胞を樹立し、CD4, 8, 25, 117, 34, 45に対する単クローン抗体産生クローンを単離するとともに、これらの特性をヒトおよびコモンマーモセット血球細胞を用いて検討した。
4. Zinc finger nuclease(ZFNs)法を用いたp53ノックイン技術開発：平成20年度に設計したジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFNs)(コモンマーモセットp53Arg177、またはArg250の変異を作製する)ペアをヒト腫瘍細胞株293T細胞に遺伝子導入(生細胞への導入効率>90%、導入効率は免疫抗体染色法にて確認)し、導入後4日目の細胞よりゲノムを抽出し各ZFNsペアの切断効率をCellアッセイ法にて検討した。さらにこれらZFNsペアとともに蛍光タンパク質を発現する非ゲノム挿入型レンチウイルスベクター(IDLV-ZFN-IRES-Venus)を作製し、コモンマーモセットaorta-gonad-mesonephros領域より採取した細胞(AGM細胞)に遺伝子導入(生細胞への導入効率>90%、蛍光発現にて確認)し、同様の方法でZFNsペアの切断効率を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究の実施に際しては「研究開発等に係る遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令」(一部旧組換え DNA 実験指針)と各施設内動物実験に関する指針「九州大学動物実験に関する指針」「東京大学動物実験マニュアル」にのっとり各施設内委員会において承認後(承認済み)、安全かつ倫理的に研究を実施した。

C. 研究結果

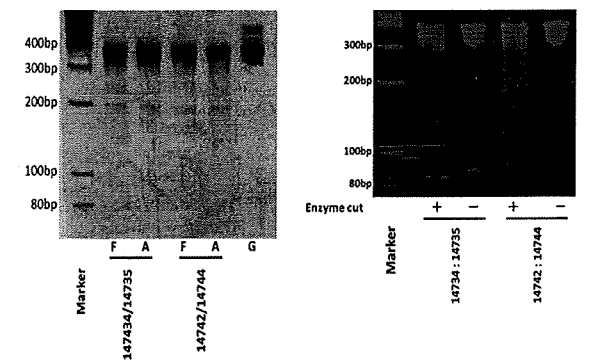
1. ATLLモデル: 経静脈的投与個体では、HTLV-1抗体価の上昇を認めなかった。対して、経腹腔内投与個体においては、投与後より現在まで1年以上、HTLV-1抗体価の持続的な上昇を認めた(次頁図)。いずれの個体の血液細胞のDNAからもHTLV-1プロウイルスが持続的に検出された。定量PCRではプロウイルス量は1%未満である。末梢血スミアでは、ATLLに典型的な花弁用核を持つ細胞(flower cell)は、現在まで認められていないが、核に軽度の切れ込みをもった細胞が散見された(下図)。以上より、抗体価に違いがあるものの、これらマーマセット個体においてHTLV-1キャリアの状態を作ることができた。



2. Ph染色体陽性ALLモデル:p190遺伝子導入造血前駆細胞の自家移植後、2個体の末梢血で4週目と8週目に、骨髄では13週目にp190遺伝子の発現が確認されたが、以降は検出されなかった。大腿骨髄内に直接ウイルスベクターを注入する方法では、長期観察の結果、大腿骨髄内にウイルスベクターを接種してから1年4ヶ月以上経過した個体I2129と個体I2223のそれぞれの末梢血単核球と末梢血好中球からp190遺伝子の発現が確認された。同時に血球ゲノムDNAにもp190遺伝子の組込が検出された。さらに、p190遺伝子に加えmll/enl融合遺伝子を共感染させた個体も設定したが、いずれの個体においても現時点まで白血病発症は認められていない。

3. 抗マーマセットCD抗原単クローン抗体の作製: コモンマーマセットT細胞分画におけるCD4ならびにCD8発現プロファイルはマウス及びヒトと類似していた。CD4およびCD8陽性細胞はコモンマーマセット脾臓より単離された。T細胞刺激後においてはCD4陽性細胞ではTh1, Th2, Th17関連サイトカインが、CD8陽性細胞では細胞障害プロテアーゼが各々検出された。CD34発現に関わらず、CD117(c-kit)陽性細胞で主にコロニー形成能をもつ細胞が認められた。

4. Zinc finger nuclease(ZFNs)法を用いたp53ノックイン技術開発: Arg177およびArg250変異作製ZFNペア各3種類について、293T細胞へ遺伝子導入し切断効率を検討したところ2日目より遺伝子導入細胞において細胞死が確認されたが、4日目には浮遊、接着両細胞においてArg177に対するZFNsペア3種類のみZFNsペアが作用したときに確認できる断片(非切断; 392bp、切断断片; 190bp)を確認できた。この3種類のうち、切断効率の高かった2種類のIDLV-ZFN-IRES-Venus(切断部位; 14734/14735、14742/14744)を293T細胞およびAGM細胞に遺伝子導入したところ、AGM細胞は2日目より細胞のパイルアップが確認でき、4日目においてZFNsによるゲノムの切断が(非切断; 392bp、切断; 287bp)確認できた(293T細胞; 図(左)、AGM細胞; 図(右))。現在3つのp53変異コモンマーマセットES細胞を作製中である。すなわち2つのIDLV-ZFN-IRES-Venusのみを遺伝子導入しArg177を除いたES細胞、ストップコドンを組み込むことにより作製されるArg177以下のp53ゲノム配列を除いたES細胞、そしてヒト悪性腫瘍に高頻度に検出される一塩基多型を持つES細胞を作製する予定である。



図(左) 293T細胞のCell1アッセイの結果 F; 浮遊細胞、A; 接着細胞、G; モックベクターを遺伝子導入した細胞 ZFNsペアによる切断断片は190bpに確認できた 図(右) AGM細胞のCell1アッセイの結果 +; ZFNsペアを遺伝子導入細胞、-; モックベクターを遺伝子導入した細胞 ZFNsペアは287bpに確認できた

D. 結論と考察 In vivoにおいてp190遺伝子の持続的な発現を観察できた。さらに白血病発症にいたるためには、1. 遺伝子導入法により詳細な検討; ウイルスベクター感染はex vivoか、個体内に直接注入か、2. 免疫抑制剤により白血病発症を加速させることは可能か、3. 付加的な遺伝子導入(Flt-3, アポトーシス抑制遺伝子、等)は必要か、等いくつかの重要な検討課題がある。 HTLV-1 産生細胞株の個体への投与(経静脈的/経腹腔的投与)により、抗体価の上昇の程度に違いを認めたものの、いずれの投与方法でもキャリア状態を作ること成功した。ヒトの場合、ATLLは一般に数十年のキャリア期間を経て発症する。プロウイルス DNA から腫瘍化に重要な Tax 蛋白が発現されるが、宿主の細胞障害性リンパ球(CTL)が、その Tax 蛋白を標的としていることが知られており、それが腫瘍化の抑制に働いていることが考えられる。従って、免疫抑制剤投与により CTL 活性を抑えることによりキャリア状態からの腫瘍化の進展を加速できる可能性が

ある。臨床現場においても、臓器移植後、FK506を投与されたHTLV-1キャリアにおいて、ATLへの進行が報告されている。

コモンマーモセットの免疫システムは基本的にはヒト、マウスと類似しているものと考えられたが、造血幹細胞システムについてはさらに検討を要するものと考えられた。

また、(財)実験動物中央研究所では、脊髄損傷、心筋梗塞、パーキンソン病、発生工学などの様々な研究にコモンマーモセットを用いている。我々は、それぞれの研究のために安楽死を行った動物の有効利用を目指して、多くの異なる領域の研究者に生体材料を提供するシステムを構築した。これにより、コモンマーモセットを用いる研究の相互的推進が可能となった。この生体材料の分与システムは、研究を推進するのみではなく、実験動物のガイドラインに記載された3Rのうち、Reductionにあたる動物実験の数の低減にも有効であると考えられた。

本研究期間中に共同研究者の佐々木らが中心になりGFPトランスジェニックコモンマーモセットが作出された。本技術をZFNs技術と組み合わせることでノックインマーモセットの作出も可能であると考えられる。実際、共同研究を行っているサンガモ社においてラットにおいては本技術が可能となったことが報告された。

E. 健康危険情報  
特になし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Yanagie, H., Tanabe, T., Sumimoto, H., Sugiyama, H., Matsuda, S., Nonaka, Y., Ogiwara, N., Sasaki, K., Tani, K., Takamoto, S., Takahashi, H., Eriguchi, M., Tumor growth suppression by adenovirus-mediated introduction of a cell growth suppressing gene tob in a pancreatic cancer model. *Biomed Pharmacother* 63:275-286, 2009
2. Tsuruta, T., Tani, K. Basophilic granulocytes. *Cell Biol Res Horizons* 2009 (in press)
3. Kummalue, T., Jiratchariyakul, W., Srisapoomi, T., Sukpanichnant, S., Hara, T., Tani, K. Antiproliferative effect of Cucurbitacin B extracted from *Trichosanthes cucumerina* L. on human cancer cell lines. *Siriraj Med J* 61: 75-77, 2009.
4. Kametani, Y., Suzuki, D., Kohu, K., Satake, M., Suemizu, H., Sasaki, E., Ito, T., Tamaoki, N., Mizushima, T., Ozawa, M., Tani, K., Kito, M., Arai, H., Koyanagi, A., Yagita, H., Habu, S. Development of monoclonal antibodies for analyzing immune and hematopoietic systems of common marmoset. *Exp Hematol* 37:1318-1329, 2009.
5. Thacker EE, Nakayama M, Smith BF, Bird RC, Muminova Z, Strong TV, Timares L, Korokhov N, O'Neill AM, de Gruijl TD, Glasgow JN, Tani K., Curiel DT. A genetically engineered adenovirus vector targeted to CD40 mediates transduction of canine dendritic cells and promotes antigen-specific immune responses in vivo. *Vaccine*. 27:7116-7124. 2009

6. Xin M, Nakamura T, Okazaki T, Inoue H, Takahashi A, Miyamoto S, Sakaguchi G, Eto M, Naito S, Takeda M, Yanagi Y, Tani, K. Enhanced Antitumor Effects of an Oncolytic Measles Virus Vaccine Strain Expressing the Wild-type N, P, L Genes on Human Renal Cell Carcinoma, *Mol Ther*. 18(3):544-51. 2010
7. Inoue T., Sugiyama D., Kurita R., Oikawa T., Kuleaw, K., Kawano H., Miura Y, Okada M., Suehiro Y., Takahashi A., Marumoto T., Inoue H., Komatsu N., Tani K. APOA-1 is a novel marker of erythroid cell maturation from hematopoietic stem cells in mice and humans. *Stem Cell Rev Rep* 2010 (in press)
8. Hamada, K., Zhang, T., Desaki, J., Nakashiro, K.-I., Ito, H., Tani, K., Koyama, Y., Hamakawa, H. Carrier cell-mediated cell lysis of squamous cell carcinoma cells by squamous cell carcinoma antigen 1 promoter-driven oncolytic adenovirus. *J. Gene Med*. 2010 (in press)
9. Murohashi M, Hinohara K, Kuroda M, Isagawa T, Tsuji S, Kobayashi S. Umezawa K, Tojo A, Aburatani H, and Gotoh N Gene set enrichment analysis provides insight into novel signaling pathways in breast cancer stem cells. *British Journal of Cancer* (2010) 102, 206–212
10. Müller, T., Fleischmann, G., Eildermann, K., Mätz-Rensing, K., Horn, P.A., Sasaki, E., Behr, R. (2009) A novel embryonic stem cell line derived from the common marmoset monkey (*Callithrix jacchus*) exhibiting germ cell-like characteristics. *Hum. Repr.*, 24:1359-72
11. Fleischmann, G., Müller, T., Behr, R., Blasczyk, R., Sasaki, E., Horn, P. A. (2009) Growth characteristics of the non-human primate embryonic stem cell line cjes001 depending on feeder cell treatment. *Cloning and Stem cells*, 11:225-33
12. Sotomaru, Y., Hirakawa, R., Shimada, A., Shiozawa, S., Sugawara, A., Oiwa, R., Nobukiyo, A., Okano, H., Tamaoki, N., Nomura, T., Hiyama, E., Sasaki, E. (2009) Pre-implantation Development of Somatic Cell Cloned Embryos in the Common Marmoset (*Callithrix jacchus*). *Cloning and Stem cells*, 11:575-83.
13. Sasaki, E., Suemizu, H., Shimada, A., Hanazawa, K., Oiwa, R., Kamioka, M., Tomioka, I., Sotomaru, Y., Hirakawa, R., Eto, T., Shiozawa, S., Maeda, T., Ito, M., Ito, R., Kito, C., Yagihashi, C., Kawai, K., Miyoshi, H., Tanioka, Y., Tamaoki, N., Habu, S., Okano, H., Nomura, T. (2009) Generation of transgenic nonhuman primates with germline transmission. *Nature*, 459: 523-7
14. Koso, H., Minami, C., Tabata, Y., Inoue, M., Sasaki, E., Satoh, S., Watanabe, S. (2009) CD73 is a novel cell surface antigen characterizes retinal photoreceptor precursor cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*;50: 5411-8

15.Hattori, F., Chen, H., Yamashita, H., Tohyama, S., Satoh, Y., Yuasa, S., Li, W., Yamakawa, H., Tanaka, T., Onitsuka, T., Shimoji, K., Ohno, Y., Egashira, T., Kaneda, R., Murata, M., Hidaka, K., Morisaki, T., Sasaki, E., Suzuki, T., Sano, M., Makino, S., Oikawa, S and Fukuda, K. (2010) A non-genetic method for purifying stem cell-derived cardiomyocytes. Nature Method., 7:61-6

## 2.学会発表

1.Ryo Kurita, Rui Kageyama, Yoshie Miura, Manabu Ozawa, Takafumi Hiramoto, Tomoko Yokoo, Michiyo Okada, Yoko Suehiro, Hiroyuki Inoue, Atsushi Takahashi, Kenzaburo Tani. In vitro generation of the hematopoietic progenitor/stem cells from tall/scl gene-transduced human ES cells. 第15回日本遺伝子治療学会年次学術集会, 大阪, 2009

2.Rui Kageyama, Ryo Kurita, Yoshie Miura, Manabu Ozawa, Takafumi Hiramoto, Tomoko Yokoo, Michiyo Okada, Yoko Suehiro, Hiroyuki Inoue, Atsushi Takahashi, Kenzaburo Tani. Induction of the hematopoietic progenitor/stem cells using viral gene transduction to human ES cells. 第71回日本血液学会学術集会, 京都, 2009

3.Ryo Kurita, Rui Kageyama, Yoshie Miura, Takafumi Hiramoto, Tomoko Yokoo, Michiyo Okada, Atsushi Takahashi, Hiroyuki Inoue, Kenzaburo Tani In vitro induction of the hematopoietic progenitor/stem cells from human ES cells.ASGCT 12<sup>th</sup> annual meeting, San Diego, 2009

4.Yoshie Miura, Ryo Kurita\*, Michiyo Okada, Rui Kageyama, Takafumi Hiramoto, Tomoko Yokoo, Megumi Narusawa, Yoko Suehiro, Hiroyuki Inoue, Tomotoshi Marumoto, Atsushi Takahashi, Kenzaburo Tani. Efficient Induction of Hematopoietic Progenitor/Stem Cell Differentiation by Lentiviral Gene Transduction of TAL1/SCL into Human ES Cells.51st ASH Annual Meeting and Exposition, New Orleans, 2009

5.井上博之、伊賀睦了、高山浩一、井上誠、長谷川護、中西洋一、谷憲三朗  
非伝播型センダイウイルスベクターによるGM-CSF遺伝子導入樹状細胞療法は担癌マウスモデルにおいて免疫学的抗腫瘍効果を誘導する。第49回日本呼吸器学会学術講演会 東京 2009年6月12-14日

6.Yosuke Yokota,Mayumi Yamamoto,Masaharu Nakayama,Hiroyuki Inoue,Koichi Takayama A,Toshiyoshi Fujiwara,Hiroyuki Mizuguchi,David T Curiel, Kenzaburo Tani. Development of new adenoviral gene therapy targeting hematological malignancies. 第15回 日本遺伝子治療学会 大阪2009年 7月9-11日

7.Yosuke Yokota,Mayumi Yamamoto,Masaharu Nakayama,Hiroyuki Inoue,Koichi Takayama, Toshiyoshi Fujiwara,Hiroyuki Mizuguchi,David T Curiel,Kenzaburo Tani. Development of new chimeric adenoviral gene therapy targeting hematological malignancies. 第71回日本血液学会学術総会、京都 2009年10月23-25日

8.Tomoko Yokoo,Ryo Kurita,Atsushi Takahashi,Michiyo Okada,Hirotaka Kawano,Yoshie Miura,Takafumi Hiramoto,Hiroyuki InoueYoko Suehiro,Daisuke Sugiyama,Hua Lu,Akihiko Yoshimura,Norio Komatsu,Kenzaburo Tani. Expression Cloning of Genes Enabling Erythropoietin-Independent Erythropoiesis in Vitro. 51<sup>th</sup> ASH (American Society of Hematology) Annual Meeting and Exposition. New Orleans, LA 2009年12月5-8日

9.Iga M, Hijikata Y, Suehiro Y, Inoue H, Tanaka Y, Shimoda S, Marumoto T, Okazaki T, Tsunoda T, Nakamura Y, Tani K. New strategies of immune and cell therapy targeting malignancy.第71回日本血液学会学術集会 京都2009, 10

10.Toshihiko Okazaki, Xin Meng, Takafumi Nakamura, Hiroyuki Inoue, Atsushi Takahashi, Gaku Sakaguchi, Masatoshi Eto, Seiji Naito, Yusuke Yanagi, Kenzaburo Tani.腫瘍溶解性麻疹ウイルスの改変による腎癌細胞への抗腫瘍効果の増強 第68回日本癌学会学術総会横浜2009年10月1-3日

11.Toshihiko Okazaki, Xin Meng, Hiroyuki Inoue, Atsushi Takahashi, Gaku Sakaguchi, Masatoshi Eto, Seiji Naito, Takafumi Nakamura, Yusuke Yanagi, Kezaburo Tani.Engineered measles virus MV-NPL as a novel oncolytic therapy第15回日本遺伝子治療学会 大阪 2009年7月9日-11日

12.Toshihiko Okazaki, Xin Meng, Takafumi Nakamura, Hiroyuki Inoue, Atsushi Takahashi, Gaku Sakaguchi, Masatoshi Eto, Seiji Naito<sup>4</sup> Yusuke Yanagi, Kezaburo Tani.MV-NPL, as a new therapeutic oncolytic measles virus candidate.12th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy.May 27-30,2009

13.土方康基、伊賀睦了、末廣陽子、中山雅晴、岡崎利彦、村上佑介、田中芳浩、於昊龍、岡田美智代、吉田浩二、角田卓也、中村祐輔、谷憲三朗 進行・再発固形腫瘍（消化器癌・肺癌）に対するCyclophosphamide(CY)併用新規腫瘍関連抗原由エピトープペプチドカクテルを用いた腫瘍特異的強化ワクチン療法の検討（第I相臨床試験）第106回 日本内科学会総会、東京 2009年4月10日～12日

14.Ratanakanit Harnprasopwat, Kiyoko Izawa, Seiichiro Kobayashi, Ai Kotani, Naoyuki Takahashi and Arinobu Tojo Conditional activation of Bcr-Abl kinase delineates time-dependent transforming events in hematopoietic cells.51<sup>th</sup> ASH Annual

14.Kunihiko Hinohara, Michiko Murohashi, Masahiko Kuroda, Takayuki Isagawa, Shingo Tsuji, Seiichiro Kobayashi, Kazuo Umezawa, Arinobu Tojo, Hiroyuki Aburatani, Noriko Gotoh Potential roles of NFκB pathways in breast cancer-initiating cells.101<sup>st</sup> AACR Annual Meeting

15.湯地晃一郎、大野伸弘、幸谷愛、小林誠一郎、内丸薫、東條有伸ニロチニブにより分子遺伝学的寛解が得られたイマチニブ抵抗性及び不耐容の慢性期CML症例 第71回日本血液学会

16.大野伸弘、湯地晃一郎、小林誠一郎、内丸薫、東條有伸イマチニブ抵抗性の急性転化期CMLに対するニロチニブの効果 第71回日本血液学会

17.横山和明、尾上和夫、小林誠一郎、長村登喜子、東條有伸イマチニブはCD8+CD26highメモリーT細胞の機能分化を阻害する 第71回日本血液学会

- 18.室橋道子, 日野原邦彦, 黒田雅彦, 砂川孝行  
辻真吾, 小林誠一郎, 梅澤一夫, 東條有伸,  
油谷浩幸, 後藤典子 ヒト乳癌幹細胞株における  
癌幹細胞の分子シグネチャー 第68回日本癌  
学会
- 19.Generation of Induced Pluripotent stem cell lines  
from adult marmoset cells. Takuji Maeda, Hiroko  
Shimada, Kazutoshi Takahashi, IKuo Tomioka,  
Seiji Shiozawa, Ryo Oiwa, Akiko Shimada, Shinya  
Yamanaka, Erika Sasaki, Hideyuki Okano 第7回  
幹細胞シンポジウム泉ガーデンギャラリー、  
東京都 2009年5月15-16日
- 20.Generating induced Pluripotent Stem Cells from  
Common Marmoset Bone Marrow Cells IKuo  
Tomioka, Takuji Maeda, Akiko Shimada, Ryo  
Oiwa, Hideyuki Okano, Erika Sasaki 第7回幹  
細胞シンポジウム 2009年5月15-16日
- 21.Generating induced Pluripotent Stem Cells from  
Common Marmoset Bone Marrow Cells IKuo  
Tomioka, Takuji Maeda, Akiko Shimada, Ryo  
Oiwa, Hideyuki Okano, Erika Sasaki ISSCR  
(International Society for Stem Cell Research) 7th  
Annual Meeting 2009年7月8-11日
- 22.Generation of Induced Pluripotent stem cell lines  
from adult marmoset cells Takuji Maeda, Hiroko  
Shimada, Kazutoshi Takahashi, IKuo Tomioka,  
Seiji Shiozawa, Ryo Oiwa, Akiko Shimada, Shinya  
Yamanaka, Erika Sasaki, Hideyuki Okano ISSCR  
(International Society for Stem Cell Research) 7th  
Annual Meeting 2009年7月8-11日
- 23.コモンマーモセット卵子体外成熟培地へのブタ卵  
液添加の影響 富岡郁夫、島田亜樹子、吉岡  
耕治、佐々木えりか 第102回日本繁殖生物学  
学会大会、近畿大学、奈良 2009年9月10日
- 24.タイムラプスイメージングによるマーモセット未成  
熟卵子の成熟時間の解析 富岡 郁夫、島田 亜  
樹子、高橋 司、佐々木 えりか 第43回日本実  
験動物技術者協会総会 2009年10月9日
- 25.Towards generation of transgenic nonhuman  
primates 佐々木えりか、岡野栄之、第52回日本  
神経化学学会大会 2009年6月23日
- 26.Generation of transgenic nonhuman primates with  
germline transmission Erika Sasaki Marmoset  
Research Group of the America 2009, 2009年7月  
30日
- 27.マーモセット iPS 細胞の樹立の現状 佐々木えり  
か 第54回日本人類遺伝学会 2009年9月24日
- 28.Generation of transgenic non-human primate  
Erika Sasaki 幹細胞生物学と発生工学の最前線  
ミニシンポジウム 2009年11月19日
- 29.遺伝子改変マーモセットの作出法の確立 佐々木  
えりか つくば実験動物研究会 2009年12月4日
- 30.遺伝子改変マーモセットの作出 佐々木えりか  
宮崎サイエンスキャンプ 2009年2月27日
- 31.遺伝子改変霊長類の作出と今後の課題 佐々木  
えりか 第9回再生医療学会総会 2009年3月18日
- 32.遺伝子改変マーモセットの作出と今後の展開  
佐々木えりか 第149回日本獣医学会総会  
2009年3月27日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
1. 発明の名称: Novel erythrocyte differentia  
tion inducing method and novel erythrocyte  
differentiation marker 5  $\alpha$ -reductase inhi  
bitor  
出願番号: 61/310353, 2010-03-04  
2010/4/26出願完了  
学内整理番号: QP090176-US
2. 発明の名称: Therapeutic agent for maligna  
nt tumor using oncolytic measles virus, an  
d therapeutic method using the agent  
出願番号: 61/308477, 2010-02-26  
2010/4/26出願完了  
学内整理番号: QP090177-US
3. 発明の名称: NOVEL ONCOLYTIC VIRUS FOR  
LUNG CANCER  
整理番号 QP090217-US  
代表発明者: 谷 憲三朗  
出願番号: 61/315129  
出願日: 2010-03-18
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

小型霊長類コモンマーモセット白血病モデル作出に関する研究

分担研究者 谷 憲三朗 九州大学生体防御医学研究所・ゲノム病態学分野 教授

研究要旨

p190 bcr/ablレンチウイルスベクターによる遺伝子導入自家末梢血幹細胞移植法ならびに骨髓内への同レンチウイルスベクターの直接注入により、コモンマーモセットにおいて白血病（急性リンパ性白血病）の作出を試みた。後者において持続的にコモンマーモセット末梢血ならびに骨髓細胞内にp190遺伝子発現を認め、しかし、その後p190遺伝子は検出限界以下となり現在に至っている。白血病発症を加速させるべく、免疫抑制剤の投与やp190以外の付加的な遺伝子の投与等を検討している。さらに将来的に遺伝子ノックインモデル作出を目的にコモンマーモセットES細胞もしくは受精卵p53遺伝子への変異導入を目的にコモンマーモセットp53ゲノム解析とそれを基にZinc finger nucleaseDNAを設計・構築し、現在その細胞への効果を検討中である。

A. 研究目的

1. Ph(フィラデルフィア)染色体陽性成人急性リンパ性白血病は、9番染色体と22番染色体の長腕間相互転座t(9;22)(q34;q11)(Ph染色体)から生じるp190 bcr/abl遺伝子を主病因とする予後不良の造血期悪性腫瘍である。この霊長類モデルは未だなく、本研究では、その確立を目的とする。

2. 将来的に悪性腫瘍を含む種々の疾患モデルを作出することを最終的にサルES細胞を用いたノックイン法による悪性腫瘍モデル作出技術の開発を行うことを目的として新しい技術であるZinc finger nuclease法を用いた悪性腫瘍高発症コモンマーモセットモデル作出に向けた基礎研究を実施する。

B. 研究方法

1. Ph染色体陽性ALLモデル：p190遺伝子をin vitroでマーモセットの末梢血単核細胞導入後、ブスルファン前処置後に自家移植した。あるいは5-Fluorouracilを大腿静脈内に投与後、プレドゾン投与による免疫抑制を行い左右両膝関節の1cm直上から大腿骨髓内にp190遺伝子発現レンチウイルスベクターを骨髓内に注入した。各個体においてp190 bcr-abl mRNA / DNAをRT-PCR法 / PCR法を用いて検出した。

2 ZFNs (Zinc finger nuclease) 法を用いたp53ノックイン技術開発：平成20年度に設計したジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFNs) (コモンマーモセットp53Arg177、またはArg250の変異を作製する) ペアをヒト腫瘍細胞株293T細胞に遺伝子導入 (生細胞への導入効率>90%、導入効率は免疫抗体染色法にて確認) し、導入後4日目の細胞よりゲノムを抽出し各ZFNsペアの切断効率をCell1アッセイ法にて検討した。さらにこれらZFNsペアとともに蛍光タンパク質を発現する非ゲノム挿入型レンチウイルスベクター

(IDLV-ZFN-IRES-Venus) を作製し、コモンマーモセットaorta-gonad-mesonephros領域より採取した細胞 (AGM細胞) に遺伝子導入 (生細胞への導入効率>90%、蛍光発現にて確認) し、同様の方法でZFNsペアの切断効率を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究の実施に際しては「研究開発等に係る遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令」(一部旧組換えDNA実験指針)と各施設内動物実験に関する指針「九州大学動物実験に関する指針」「東京大学動物実験マニュアル」にのっとり各施設内委員会において承認後(承認済み)、安全かつ倫理的に研究を実施した。

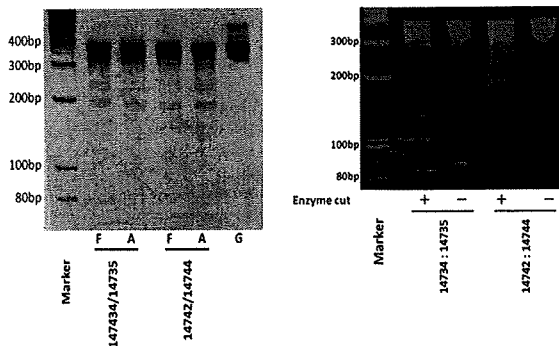
C. 研究結果

1. Ph染色体陽性ALLモデル：p190遺伝子導入造血前駆細胞の自家移植後、2個体の末梢血で4週目と8週目に、骨髓では13週目にp190遺伝子の発現が確認されたが、以降は検出されなかった。大腿骨髓内に直接ウイルスベクターを注入する方法では、長期観察の結果、大腿骨髓内にウイルスベクターを接種してから1年4ヶ月以上経過した個体I2129と個体I2223のそれぞれの末梢血単核球と末梢血好中球からp190遺伝子の発現が確認された。同時に血球ゲノムDNAにもp190遺伝子の組込が検出された。さらに、p190遺伝子に加えm11/en1融合遺伝子を共感染させた個体も設定したが、いずれの個体においても現時点まで白血病発症は認められていない。

2. ZFNs法を用いたp53ノックイン技術開発：Arg177およびArg250変異作製ZFNsペア各3種類について、293 T細胞へ遺伝子導入し切断効率を検討したところ2日目より遺伝子導入細胞において細胞死が確認されたが、4日目には浮遊、接着両細胞においてArg177に対するZFNペア3種類のみZFNsペアが作用したときに確認できる断片(非切断；392bp、切断断片；190bp)を確認できた。この3種類のうち、切断効率の高かった2種類のIDLV-ZFN-IRES-Venus(切断部位；14734/14735、14742/14744)を293T細胞およびAGM細胞に遺伝子導入したところ、AGM細胞は2日目より細胞のパイルアップが確認でき、4日目においてZFNsによるゲノムの切断が(非切断；392bp、切断；287bp)確認できた(293T細胞；下図(左)、AGM細胞；下図(右))。



現在3つのp53変異コモンマーマセセットES細胞を作製している。すなわち2つのIDLV-ZFN-IRES-Venusのみを遺伝子導入しArg177を除いたES細胞、ストップコドンを組み込むことにより作製されるArg177以下のp53ゲノム配列を除いたES細胞、そしてヒト悪性腫瘍に高頻度に検出される一塩基多型を持つES細胞を作製する予定である



図(左) 293T細胞のCellアッセイの結果  
F; 浮遊細胞, A; 接着細胞, G; モックベクターを遺伝子導入した細胞  
ZFNsペアによる切断断片は190bpに確認できた  
図(右) AGM細胞のCellアッセイの結果  
+; ZFNsペアを遺伝子導入細胞, -; モックベクターを遺伝子導入した細胞  
ZFNsペアは287bpに確認できた

#### D. 結論と考察

霊長類・Ph染色体陽性ALLモデル: *in vivo*においてp190遺伝子の持続的な発現を観察できた。さらに白血病発症にいたるためには、1. 遺伝子導入法により詳細な検討; ウイルスベクター感染は*ex vivo*か、個体内に直接注入か、2. 免疫抑制剤により白血病発症を加速させることは可能か、3. 付加的な遺伝子導入(Flt-3, アポトーシス抑制遺伝子、等)は必要か、等いくつかの重要な検討課題がある。一方、ZFNs法はコモンマーマセセットに疾患モデルを作出する際に有用である可能性が徐々に明らかになってきており、今後さらに検討を重ねていくことが重要であると考えられた。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Yanagie, H., Tanabe, T., Sumimoto, H., Sugiyama, H., Matsuda, S., Nonaka, Y., Ogiwara, N., Sasaki, K., Tani, K., Takamoto, S., Takahashi, H., Eriguchi, M., Tumor growth suppression by adenovirus-mediated introduction of a cell growth suppressing gene to in a pancreatic cancer model. *Biomed Pharmacother* 63:275-286, 2009
2. Tsuruta, T., Tani, K. Basophilic granulocytes. *Cell Biol Res Horizons* 2009 (in press)
3. Kummalu, T., Jiratchariyakul, W., Srisapoomi, T., Sukpanichnant, S., Hara, T., Kenzaburo T., Antiproliferative effect of Cucurbitacin B extracted from *Trichosanthes cucumerina* L. on human cancer cell lines. *Siriraj Med J* 61: 75-77, 2009.
4. Kametani, Y., Suzuki, D., Kohu, K., Satake, M., Suemizu, H., Sasaki, E., Ito, T., Tamaoki, N., Mizushima, T., Ozawa, M., Tani, K., Kito, M., Arai, H., Koyanagi, A., Yagita, H., Habu, S. Development of monoclonal antibodies for analyzing immune and hematopoietic systems of common marmoset. *Exp Hematol* 37:1318-1329, 2009.

5. Thacker EE, Nakayama M, Smith BF, Bird RC, Muminova Z, Strong TV, Timares L, Korokhov N, O'Neill AM, de Grujil TD, Glasgow JN, Tani K, Curiel DT. A genetically engineered adenovirus vector targeted to CD40 mediates transduction of canine dendritic cells and promotes antigen-specific immune responses *in vivo*. *Vaccine*. 27:7116-7124. 2009

##### 2. 学会発表

1. Ryo Kurita, Rui Kageyama, Yoshie Miura, Manabu Ozawa, Takafumi Hiramoto, Tomoko Yokoo, Michiyo Okada, Yoko Suehiro, Hiroyuki Inoue, Atsushi Takahashi, Kenzaburo Tani. *In vitro* generation of the hematopoietic progenitor/stem cells from tal1/scl gene-transduced human ES cells. 第15回日本遺伝子治療学会年次学術集会, 大阪, 2009
2. Rui Kageyama, Ryo Kurita, Yoshie Miura, Manabu Ozawa, Takafumi Hiramoto, Tomoko Yokoo, Michiyo Okada, Yoko Suehiro, Hiroyuki Inoue, Atsushi Takahashi, Kenzaburo Tani. Induction of the hematopoietic progenitor/stem cells using viral gene transduction to human ES cells. 第71回日本血液学会学術集会, 京都, 2009
3. Ryo Kurita, Rui Kageyama, Yoshie Miura, Takafumi Hiramoto, Tomoko Yokoo, Michiyo Okada, Atsushi Takahashi, Hiroyuki Inoue, Kenzaburo Tani. *In vitro* induction of the hematopoietic progenitor/stem cells from human ES cells. ASGCT 12<sup>th</sup> annual meeting, San Diego, 2009
4. Yoshie Miura, Ryo Kurita\*, Michiyo Okada, Rui Kageyama, Takafumi Hiramoto, Tomoko Yokoo, Megumi Narusawa, Yoko Suehiro, Hiroyuki Inoue, Tomotoshi Marumoto, Atsushi Takahashi, Kenzaburo Tani. Efficient Induction of Hematopoietic Progenitor/Stem Cell Differentiation by Lentiviral Gene Transduction of TAL1/SCL into Human ES Cells. 51st ASH Annual Meeting and Exposition, New Orleans, 2009
5. 井上博之, 伊賀睦了, 高山浩一, 井上誠, 長谷川護, 中西洋一, 谷憲三朗. 非伝播型センダイウイルスベクターによるGM-CSF遺伝子導入樹状細胞療法は担癌マウスモデルにおいて免疫学的抗腫瘍効果を誘導する. 第49回日本呼吸器学会学術講演会 東京 2009年6月12-14日
6. Yosuke Yokota, Mayumi Yamamoto, Masaharu Nakayama, Hiroyuki Inoue, Koichi Takayama, Toshiyoshi Fujiwara, Hiroyuki Mizuguchi, David T Curiel, Kenzaburo Tani. Development of new adenoviral gene therapy targeting hematological malignancies. 第15回日本遺伝子治療学会 大阪2009年7月9-11日
7. Yosuke Yokota, Mayumi Yamamoto, Masaharu Nakayama, Hiroyuki Inoue, Koichi Takayama, Toshiyoshi Fujiwara, Hiroyuki Mizuguchi, David T Curiel, Kenzaburo Tani. Development of new chimeric adenoviral gene therapy targeting hematological malignancies. 第71回日本血液学会学術総会 京都 2009年10月23-25日
8. Tomoko Yokoo, Ryo Kurita, Atsushi Takahashi, Michiyo Okada, Hirotaka Kawano, Yoshie Miura, Takafumi Hiramoto, Hiroyuki Inoue, Youko Suehiro, Daisuke Sugiyama, Hua Lu, Akihiko Yoshimura, Norio Komatsu, Kenzaburo Tani. Expression Cloning of Genes Enabling Erythropoietin-Independent

Erythropoiesis in Vitro. 51<sup>th</sup> ASH (American Society of Hematology) Annual Meeting and Exposition. New Orleans, LA 2009年12月5-8日

9. Iga M, Hijikata Y, Suehiro Y, Inoue H, Tanaka Y, Shimoda S, Marumoto T, Okazaki T, Tsunoda T, Nakamura Y, Tani K. New strategies of immune and cell therapy targeting malignancy. 第71回日本血液学会学術集会 京都2009, 10

10. Toshihiko Okazaki, Xin Meng, Takafumi Nakamura, Hiroyuki Inoue, Atsushi Takahashi, Gaku Sakaguchi, Masatoshi Eto, Seiji Naito, Yusuke Yanagi, Kezaburo Tani. 腫瘍溶解性麻疹ウイルスの改変による腎癌細胞への抗腫瘍効果の増強 第68回日本癌学会学術総会横浜2009年10月1-3

11. Toshihiko Okazaki, Xin Meng, Hiroyuki Inoue, Atsushi Takahashi, Gaku Sakaguchi, Masatoshi Eto, Seiji Naito, Takafumi Nakamura, Yusuke Yanagi, Kezaburo Tani. Engineered measles virus MV-NPL as a novel oncolytic therapy 第15回日本遺伝子治療学会 大阪 2009年7月9日-11日

12. Toshihiko Okazaki, Xin Meng, Takafumi Nakamura, Hiroyuki Inoue, Atsushi Takahashi, Gaku Sakaguchi, Masatoshi Eto, Seiji Naito<sup>4</sup> Yusuke Yanagi, Kezaburo Tani. MV-NPL, as a new therapeutic oncolytic measles virus candidate. 12th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy. May 27-30, 2009

13. 土方康基、伊賀睦了、末廣陽子、中山雅晴、岡崎利彦、村上佑介、田中芳浩、於昊龍、岡田美智代、吉田浩二、角田卓也、中村祐輔、谷憲三朗 進行・再発固形腫瘍（消化器癌・肺癌）に対するCyclophosphamide(CY)併用新規腫瘍関連抗原由エピトープペプチドカクテルを用いた腫瘍特異的強化ワクチン療法の検討（第I相臨床試験）第106回 日本内科学会総会、東京 2009年4月10日～12日

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

コモンマーモセットATLLモデル作出に関する研究

主任研究者 谷 憲三郎 九州大学生体防御医学研究所・ゲノム病態学分野 教授  
分担研究者 小林誠一郎 東京大学医科学研究所・分子療法研究分野 助教

研究要旨

成人T細胞性白血病の霊長類モデルの作出。ヒトにおいてHTLV-1ウイルスの感染後、長期間のキャリア状態を経て成人T細胞性白血病・リンパ腫(ATLL)が発症する。その霊長類モデルの作出を目的として、コモンマーモセット(*Clitoris Bacchus*)個体にHTLV-1産生細胞株:MT-2細胞を、腹腔内および経静脈的投与した。腹腔内投与個体において持続的な(1年間以上)HTLV-1抗体価の上昇とプロウイルスの検出を認めており、キャリア状態を作出できた。さらに、免疫抑制剤(FK506)の投与により白血病発症を加速させることを試みる。

A. 研究目的

成人T細胞性白血病・リンパ腫(ATLL)は、HTLV-1ウイルスの感染後、長期間のキャリア状態を経て発症する予後不良の造血期悪性腫瘍である。マウス、ラットのATLLモデルはすでに報告されているが、ヒトと遺伝学的背景がより近い霊長類のモデルはまだ確立されていない。本研究では、その確立を目的とする。

B. 研究方法

ATLLモデル:HTLV-1産生MT-2細胞株を経静脈あるいは経腹腔内に霊長類であるコモンマーモセットに投与し、経時的に採血を行い、HTLV-1抗体価、HTLV-1プロウイルス量、末梢血スメアを経時的に観察した。

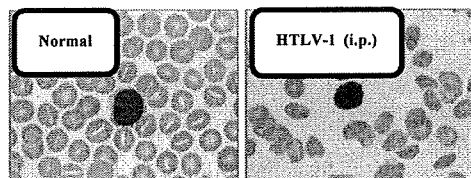
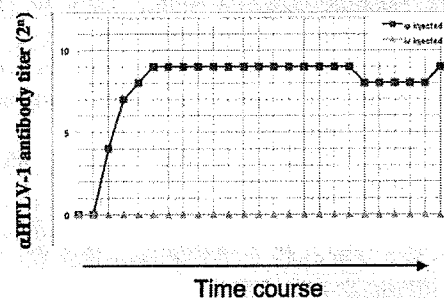
(倫理面への配慮)

本研究の実施に際しては「研究開発等に係る遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令」(一部旧組換えDNA実験指針)と各施設内動物実験に関する指針「九州大学動物実験に関する指針」「東京大学動物実験マニュアル」にのっとり各施設内委員会において承認後(承認済み)、安全かつ倫理的に研究を実施した。

D. 研究結果

1. ATLLモデル:経静脈的投与個体では、HTLV-1抗体価の上昇を認めなかった。対して、経腹腔内投与個体においては、投与後より現在まで1年以上、HTLV-1抗体価の持続的な上昇を認めた(右頁上図)。いずれの個体の血液細胞のDNAからもHTLV-1プロウイルスが持続的に検出された。定量PCRではプロウイルス量は1%未満である。末梢血スメアでは、ATLLに典型的な花弁用核を持つ細胞(flower cell)は、現在まで認められていないが、核に軽度の切れ込みをもった細胞が散見された(右頁下図)。以上より、抗体価に違いがあるものの、これらマーモセット個体において、HTLV-1キャリアの状態を作出できた。

MT-2細胞の腹腔内(赤)あるいは経静脈的(緑)経由の接種



E. 結論と考察

1. 霊長類・ATLLモデル:HTLV-1産生細胞株の個体への投与(経静脈的/経腹腔的投与)により、抗体価の上昇の程度に違いを認めたものの、いずれの投与方法でもキャリア状態を作ること成功した。ヒトの場合、ATLLは一般に数十年のキャリア期間を経て発症する。プロウイルスDNAから腫瘍化に重要なTax蛋白が発現されるが、宿主の細胞障害性リンパ球(CTL)が、そのTax蛋白を標的としていることが知られており、それが腫瘍化の抑制に働いていることが考えられる。従って、免疫抑制剤投与によりCTL活性を抑えることでキャリア状態からの腫瘍化の進展を加速できる可能性がある。臨床現場においても、臓器移植後、FK506を投与されたHTLV-1キャリアにおいて、ATLLへの進行が報告されている。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Murohashi M, Hinohara K, Kuroda M, Isagawa T, Tsuji S, Kobayashi S, Umezawa K, Tojo A, Aburatani H, and Gotoh N  
Gene set enrichment analysis provides insight into novel signaling pathways in breast cancer stem cells. British Journal of Cancer (2010) 102, 206–212

2. 学会発表

1. Ratanakanit Harnprasopwat, Kiyoko Izawa, Seiichiro Kobayashi, Ai Kotani, Naoyuki Takahashi and Arinobu Tojo  
Conditional activation of Bcr-Abl kinase delineates time-dependent transforming events in hematopoietic cells.  
51<sup>th</sup> ASH Annual Meeting

2. Kunihiko Hinohara, Michiko Murohashi, Masahiko Kuroda, Takayuki Isagawa, Shingo Tsuji, Seiichiro Kobayashi, Kazuo Umezawa, Arinobu Tojo, Hiroyuki Aburatani, Noriko Gotoh  
Potential roles of NFκB pathways in breast cancer-initiating cells.  
101<sup>st</sup> AACR Annual Meeting

3. 湯地晃一郎, 大野伸弘, 幸谷愛, 小林誠一郎, 内丸薫, 東條有伸  
ニロチニブにより分子遺伝学的寛解が得られたイマチニブ抵抗性及び不耐容の慢性期CML症例 第71回日本血液学会

4. 大野伸弘, 湯地晃一郎, 小林誠一郎, 内丸薫, 東條有伸  
イマチニブ抵抗性の急性転化期CMLに対するニロチニブの効果 第71回日本血液学会

5. 横山和明, 尾上和夫, 小林誠一郎, 長村登喜子, 東條有伸  
イマチニブはCD8+CD26<sup>high</sup>メモリーT細胞の機能分化を阻害する 第71回日本血液学会

6. 室橋道子, 日野原邦彦, 黒田雅彦, 砂川孝行, 辻真吾, 小林誠一郎, 梅澤一夫, 東條有伸, 油谷浩幸, 後藤典子  
ヒト乳癌幹細胞株における癌幹細胞の分子シグネチャー 第68回日本癌学会

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

小型霊長類コモンマーモセット白血病モデル作出に関する研究  
コモンマーモセットの造血幹・前駆細胞の単離に関する研究

主任研究者 谷 憲三朗 九州大学生体防御医学研究所・ゲノム病態学分野 教授  
分担研究者 佐々木えりか 実験動物中央研究所・胚性幹細胞生物学・室長

研究要旨

本研究はコモンマーモセット造血および免疫系細胞をより科学的に同定・解析することを目的に、共同研究としてコモンマーモセット単クローン抗体を作製するとともに、その特性を検討した。さらにこれらの研究に供するためのコモンマーモセット骨髄細胞の供給支援を継続的に実施した。

A. 研究目的

コモンマーモセットはライフスパンが20年程度有り、他の齧歯類実験動物モデルと比較して著しく長期である。従って、白血病遺伝子の導入に成功した場合においても病態の発症に至る期間は長期間を要することが予想される。一方で、現在では多様な免疫不全マウスが実験使用可であり、異種間の細胞・組織を同マウスに移植した場合、ex vivoでのドナー細胞の分化・増殖がより短期間に起こることが期待できる。この異種間移植モデルは本研究の白血病マーモセットモデルの作出においても極めて有益な情報を提供し得るものと期待されるが、使用可能な抗体の種類が限定されていたこともあり、現在までに造血系をマーモセット由来の細胞で置き換えることに成功した免疫不全マウスモデルは報告されていない。そこで、本研究ではマーモセットの造血幹・前駆細胞移植に関与する各血球の検出に有用な抗マーモセット単クローン抗体の作製を行った。またこれら研究に供するマーモセット骨髄細胞供給の問題点についても検討を加えた。

B. 研究方法

1. 抗マーモセットCD抗原単クローン抗体の作製：抗マーモセットCD抗原単クローン抗体の作製にはマーモセット抗原cDNAおよびcDNA発現CHO (chinese hamster ovary) 細胞をBALB/cマウスにSongらの方法で免疫をしたのち、標準法にしたがいハイブリドーマ細胞を樹立し、CD4, 8, 25, 117, 34, 45に対する単クローン抗体産生クローンを単離するとともに、これらの特性をヒトおよびコモンマーモセット血球細胞を用いて検討した。

2. マーモセット骨髄細胞供給支援体制の確立：(財)本研究の遂行を支援するために、マーモセット生体材料、特に骨髄の提供を行う。マーモセットの骨髄を得るためには、生体から骨髄穿刺をいう方法も可能であるが、この方法は侵襲性が高い事、骨髄穿刺後の傷が化膿して動物を死に至らしめることが多々ある。そこで、マーモセットの骨髄を利用しない他の研究者が研究計画上、動物を安楽死させる場合に、研究者の同意を得てマーモセット骨髄の提供を行った。実験動物中央研究所にて、それぞれの研究計画に従って、または人道的エンドポイントによって安楽死したマーモセットの骨髄を提供した。安楽死は麻酔下の放血により行った。全て

の実験は(財)実験動物中央研究所の動物実験委員会によって審査を受け、承認されたものである。

(倫理面への配慮)

本研究の実施に際しては動物実験に関する指針「実験動物中央研究所実験マニュアル」にのっとり委員会において承認後安全かつ倫理的に研究を実施した。

C. 研究結果

1. マーモセットT細胞分画におけるCD4ならびにCD8発現プロファイルはマウス及びヒトと類似していた。CD4およびCD8陽性細胞はマーモセット脾臓より単離された。T細胞刺激後においてはCD4陽性細胞ではTh1, Th2, Th17 関連サイトカインが、CD8陽性細胞では細胞障害プロテアーゼが各々検出された。CD34発現に関わらず、CD117 (c-kit) 陽性細胞で主にコロニー形成能をもつ細胞が認められた。

2. 平成21年4月1日より平成21年3月31日までの期間に6回に渡って骨髄の提供を行った。その内訳は9月28日、10月19日(4匹分)、11月25日であった。

D. 結論

コモンマーモセットの免疫システムは基本的にはヒト、マウスと類似しているものと考えられたが、造血幹細胞システムについてはさらに検討を要するものと考えられた。

また、(財)実験動物中央研究所では、脊髄損傷、心筋梗塞、パーキンソン病、発生工学などの様々な研究にマーモセットを用いている。我々は、それぞれの研究のために安楽死を行った動物の有効利用を目指して、多くの異なる領域の研究者に生体材料を提供するシステムを構築した。これにより、マーモセットを用いる研究の相互的推進が可能となった。この生体材料の分与システムは、研究を推進するのみではなく、実験動物のガイドラインに記載された3Rのうち、Reductionにあたる動物実験の数の低減にも有効であると考えられた。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. Müller, T., Fleischmann, G., Eildermann, K., Mätz-Rensing, K., Horn, P.A., Sasaki, E., Behr, R. (2009) A novel embryonic stem cell line derived from the common marmoset monkey (*Callithrix jacchus*) exhibiting germ cell-like characteristics. Hum. Repr., 24:1359-72
2. Fleischmann, G., Müller, T., Behr, R., Blasczyk, R., Sasaki, E., Horn, P. A. (2009) Growth characteristics of the non-human primate embryonic stem cell line cjes001 depending on feeder cell treatment. Cloning and Stem cells, 11:225-33
3. Sotomaru, Y., Hirakawa, R., Shimada, A., Shiozawa, S., Sugawara, A., Oiwa, R., Nobukiyo, A., Okano, H., Tamaoki, N., Nomura, T., Hiyama, E., Sasaki, E. (2009) Pre-implantation Development of Somatic Cell Cloned Embryos in the Common Marmoset (*Callithrix jacchus*). Cloning and Stem cells, 11:575-83.
4. Sasaki, E., Suemizu, H., Shimada, A., Hanazawa, K., Oiwa, R., Kamioka, M., Tomioka, I., Sotomaru, Y., Hirakawa, R., Eto, T., Shiozawa, S., Maeda, T., Ito, M., Ito, R., Kito, C., Yagihashi, C., Kawai, K., Miyoshi, H., Tanioka, Y., Tamaoki, N., Habu, S., Okano, H., Nomura, T. (2009) Generation of transgenic nonhuman primates with germline transmission. Nature, 459: 523-7
5. Koso, H., Minami, C., Tabata, Y., Inoue, M., Sasaki, E., Satoh, S., Watanabe, S. (2009) CD73 is a novel cell surface antigen characterizes retinal photoreceptor precursor cells. Invest Ophthalmol Vis Sci.;50: 5411-8
6. Kametani, Y., Suzuki, D., Kohu, K., Satake, M., Suemizu, H., Sasaki, E., Ito, T., Tamaoki, N., Mizushima, T., Ozawa, M., Tani, K., Kito, M., Arai, H., Koyanagi, A., Yagita, H., Habu, S. (2009) Development of Monoclonal Antibodies for Analyzing Immune and Hematopoietic Systems of Common Marmoset. Exp Hematol., 37:1318-29.
7. Hattori, F., Chen, H., Yamashita, H., Tohyama, S., Satoh, Y., Yuasa, S., Li, W., Yamakawa, H., Tanaka, T., Onitsuka, T., Shimoji, K., Ohno, Y., Egashira, T., Kaneda, R., Murata, M., Hidaka, K., Morisaki, T., Sasaki, E., Suzuki, T., Sano, M., Makino, S., Oikawa, S and Fukuda, K. (2010) A non-genetic method for purifying stem cell-derived cardiomyocytes. Nature Method., 7:61-6

2. 学会発表

- 1.Generation of Induced Pluripotent stem cell lines from adult marmoset cells. Takuji Maeda, Hiroko Shimada, Kazutoshi Takahashi, IKuo Tomioka, Seiji Shiozawa, Ryo Oiwa, Akiko Shimada, Shinya Yamanaka, Erika Sasaki, Hideyuki Okano 第7回幹細胞シンポジウム泉ガーデンギャラリー、東京都 2009年5月15-16日

2. Generating induced Pluripotent Stem Cells from Common Marmoset Bone Marrow Cells IKuo Tomioka, Takuji Maeda, Akiko Shimada, Ryo Oiwa, Hideyuki Okano, Erika Sasaki 第7回幹細胞シンポジウム 2009年5月15-16日

3. Generating induced Pluripotent Stem Cells from Common Marmoset Bone Marrow Cells Ikuo Tomioka, Takuji Maeda, Akiko Shimada, Ryo Oiwa, Hideyuki Okano, Erika Sasaki ISSCR (International Society for Stem Cell Research) 7th Annual Meeting 2009年7月8-11日

4. Generation of Induced Pluripotent stem cell lines from adult marmoset cells Takuji Maeda, Hiroko Shimada, Kazutoshi Takahashi, IKuo Tomioka, Seiji Shiozawa, Ryo Oiwa, Akiko Shimada, Shinya Yamanaka, Erika Sasaki, Hideyuki Okano ISSCR (International Society for Stem Cell Research) 7th Annual Meeting 2009年7月8-11日

5. コモンマーモセット卵子体外成熟培地へのブタ卵胞液添加の影響 富岡郁夫、島田亜樹子、吉岡耕治、佐々木えりか 第102回日本繁殖生物学会大会、近畿大学、奈良 2009年9月10日

6. タイムラプスイメージングによるマーモセット未成熟卵子の成熟時間の解析 富岡郁夫、島田亜樹子、高橋司、佐々木えりか 第43回日本実験動物技術者協会総会 2009年10月9日

7. Towards generation of transgenic nonhuman primates 佐々木えりか、岡野栄之、第52回日本神経化学学会大会 2009年6月23日

8. Generation of transgenic nonhuman primates with germline transmission Erika Sasaki Marmoset Research Group of the America 2009, 2009年7月30日

9. マーモセット iPS 細胞の樹立の現状 佐々木えりか 第54回日本人類遺伝学会 2009年9月24日

10. Generation of transgenic non-human primate Erika Sasaki 幹細胞生物学と発生工学の最前線ミニシンポジウム 2009年11月19日

11. 遺伝子改変マーモセットの作出法の確立 佐々木えりかつくば実験動物研究会 2009年12月4日

12. 遺伝子改変マーモセットの作出 佐々木えりか 宮崎サイエンスキャンプ 2009年2月27日

13. 遺伝子改変霊長類の作出と今後の課題 佐々木えりか 第9回再生医療学会総会 2009年3月18日

14. 遺伝子改変マーモセットの作出と今後の展開 佐々木えりか 第149回日本獣医学会総会 2009年3月27日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

書籍

| 著者氏名 | 論文タイトル名   | 書籍全体の編集者名 | 書籍名    | 出版社名 | 出版地 | 出版年  | ページ     |
|------|-----------|-----------|--------|------|-----|------|---------|
| 谷憲三朗 | がんと免疫の最前線 | 武藤徹一郎     | 免疫細胞治療 | 幻冬舎  | 東京都 | 2009 | 110-119 |

雑誌

|   |   |                        |          |           |      |
|---|---|------------------------|----------|-----------|------|
| Yanagie , H., , Tanabe, T., Sumimoto, H., Sugiyama, H., Matsuda, S., Nonaka, Y., Ogiwara, N., Sasaki, K., Tani, K.,, Takamoto, S., Tkahashi, H., Eriguchi, M.                               | Tumor growth suppression by adenovirus- mediated introduction of a cell growth suppressing gene tob in a pancreatic cancer model.                                   | Biomed Pharmacother    | 63       | 275-286   | 2009 |
| Tsuruta, T., Tani,K.  | Basophilic granulocytes   | Cell Biol Res Horizons | in press |           | 2009 |
| Kummalue,T., Jiratchariyakul,W.,Srisapom, T., Sukpanichnant, S.,Hara,T., Kenzaburo T.,  | Antiproliferative effect of Cucurbitacin B extracted from Trichosanthes cucumerina L. on human cancer cell lines.   | Siriraj Med J          | 61       | 75-77     | 2009 |
| Kametani, Y., Suzuki, D., Kohu, K., Satakae, M.,, Suemizu, H., Sasaki, E., Ito, T., Tamaoki, N., Mizushima, T., Ozawa, M., Tani, K., Kito, M., Arai, H., Koyanagi, A., Yagita, H., Habu, S. | Development of monoclonal antibodies for analyzing immune and hematopoietic systems of common marmoset.   | Exp Hematol            | 37       | 1318-1329 | 2009 |
| Thacker EE, Nakayama M, Smith BF, Bird RC, Muminova Z, Strong TV, Timares L, Korokhov N, O'Neill AM, de Gruijl TD, Glasgow JN, Tani K,Curiel DT.  | A genetically engineered adenovirus vector targeted to CD40 mediates transduction of canine dendritic cells and promotes antigen-specific immune responses in vivo. | Vaccine                | 27       | 7116-7124 | 2009 |
| Xin M, Nakamura T, Okazaki T, Inoue H, Takahashi A ,Miyamoto S, Sakaguchi G, Eto M, Naito S, Takeda M , Yanagi Y,Tani, K  | Enhanced Antitumor Effects of an Oncolytic Measles Virus Vaccine Strain Expressing the Wild-type N, P, L Genes on Human Renal Cell Carcinoma,                       | Mol Ther               | 18(3)    | 544-51    | 2010 |
| Inoue T., Sugiyama D., Kurita R., Oikawa T., Kuleaw, K., Kawano H., Miura Y, Okada M., Suehiro Y., Takahashi A., Marumoto T., Inoue H., Komatsu N., Tani K.                                 | APOA-1 is a novel marker of erythroid cell maturation from hematopoietic stem cells in mice and humans.   | Stem Cell Rev Rep      | in press |           |      |

|  |   |                           |          |         |      |
|--|---|---------------------------|----------|---------|------|
| Hamada,K., Zhang, T.,Desaki, J., Nakashiro,K-I., Ito, H., Tani,K., Koyama, Y., Hamakawa, H   | Carrier cell-mediated cell lysis of squamous cell carcinoma cells by squamous cell carcinomaantigen 1 promoter-driven oncolytic adenovirus. | J. Gene Med               | in press |         |      |
| Murohashi M, Hinohara K, Kuroda M, Isagawa T, Tsuji S, Kobayashi S, Umezawa K, Tojo A, Aburatani H, and Gotoh N  | Gene set enrichment analysis provides insight into novel signaling pathways in breast cancer stem cells.                                    | British Journal of Cancer | 102      | 206-212 |      |
| Müller, T., Fleischmann, G., Eildermann, K., Mätz-Rensing, K., Horn, PA., Sasaki, E., Behr, R.   | A novel embryonic stem cell line derived from the common marmoset monkey (Callithrix jacchus) exhibiting germ cell-like characteristics.    | Hum. Repr.                | 24       | 1359-72 | 2009 |
| Fleischmann, G., Müller, T., Behr, R., Blasczyk, R., Sasaki, E., Horn, P. A.   | Growth characteristics of the non-human primate embryonic stem cell line cjes001 depending on feeder cell treatment.                        | Cloning and Stem cells    | 11       | 225-33  | 2009 |
| Sotomaru, Y., Hirakawa, R., Shimada, A., Shiozawa, S., Sugawara, A., Oiwa, R., Nobukiyo, A., Okano, H., Tamaoki, N., Nomura, T., Hiyama, E., Sasaki, E.  | Pre-implantation Development of Somatic Cell Cloned Embryos in the Common Marmoset (Callithrix jacchus)                                     | Cloning and Stem cells    | 11       | 575-83  | 2009 |
| Sasaki, E., Suemizu, H., Shimada, A., Hanazawa, K., Oiwa, R., Kamioka, M., Tomioka, I., Sotomaru, Y., Hirakawa, R., Eto, T., Shiozawa, S., Maeda, T., Ito, M., Ito, R., Kito, C., Yagihashi, C., Kawai, K., Miyoshi, H., Tanioka, Y., Tamaoki, N., Habu, S., Okano, H., Nomura, T.     | Generation of transgenic nonhuman primates with germline transmission.  | Nature                    | 459      | 523-7   | 2009 |
| Koso, H., Minami, C., Tabata, Y., Inoue, M., Sasaki, E., Satoh, S., Watanabe, S.   | CD73 is a novel cell surface antigen characterizes retinal photoreceptor precursor cells. Invest Ophthalmol                                 | Invest Ophthalmol Vis Sci | 50       | 5411-8  | 2009 |
| Hattori, F., Chen, H., Yamashita, H., Tohyama, S., Satoh, Y., Yuasa, S., Li, W., Yamakawa, H., Tanaka, T., Onitsuka, T., Shimoji, K., Ohno, Y., Egashira, T., Kaneda, R., Murata, M., Hidaka, K., Morisaki, T., Sasaki, E., Suzuki, T., Sano, M., Makino, S., Oikawa, S and Fukuda, K. | A non-genetic method for purifying stem cell-derived cardiomyocytes   | Nature Method             | 7        | 61-66   | 2010 |



Original article

# Tumor growth suppression by adenovirus-mediated introduction of a cell growth suppressing gene *tob* in a pancreatic cancer model

Hironobu Yanagie<sup>a,b,\*</sup>, Tuyoshi Tanabe<sup>c</sup>, Hidetoshi Sumimoto<sup>d</sup>,  
Hirotaka Sugiyama<sup>b</sup>, Satoru Matsuda<sup>e</sup>, Yasumasa Nonaka<sup>f</sup>, Naoko Ogiwara<sup>g</sup>,  
Katsunori Sasaki<sup>g</sup>, Kensaburo Tani<sup>h</sup>, Shinichi Takamoto<sup>b,i</sup>,  
Hiroyuki Takahashi<sup>a,b</sup>, Masazumi Eriguchi<sup>b,j</sup>

<sup>a</sup> Department of Cardiac Surgery, Cooperative Unit of Medicine and Engineering Research,  
The University of Tokyo Hospital, Tokyo 113-8655, Japan

<sup>b</sup> Department of Nuclear Engineering and Management, Graduate School of Engineering,  
The University of Tokyo, Tokyo 113-8655, Japan

<sup>c</sup> National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Ibaragi 305-8562, Japan

<sup>d</sup> Division of Cellular Signaling, Institute for Advanced Medical Research, Keio University School of Medicine, Tokyo 160-8582, Japan

<sup>e</sup> Department of Molecular Pathogenesis, Nagoya University School of Medicine, Aichi 466-8560, Japan

<sup>f</sup> Department of Surgery, Hoyo Hospital, Iwate 028-3111, Japan

<sup>g</sup> Department of Anatomy, Shinshu University School of Medicine, Nagano 390-8621, Japan

<sup>h</sup> Medical Institute of Bioregulation, Kyusyu University, Fukuoka 874-0838, Japan

<sup>i</sup> Department of Cardiac Surgery, The University of Tokyo Hospital, Tokyo 113-8655, Japan

<sup>j</sup> Department of Microbiology, Syowa University School of Pharmaceutical Sciences, Tokyo 142-8555, Japan

Received 18 April 2008; accepted 29 April 2008  
Available online 18 June 2008

## Abstract

TOB (transducer of ErbB-2) is a tumor suppressor that interacts with protein-tyrosine kinase receptors, including ErbB-2. Introduction of the *tob* gene into NIH3T3 cells results in cell growth suppression. In this study, we evaluated the effect of *tob* expression in pancreatic cell lines (AsPC-1, BxPC-3, SOJ) and discuss the tumor-suppressing effects of adenoviral vector expressing *tob* cDNA. We first measured the levels of endogenous *tob* mRNA being expressed in all pancreatic cancer cell lines. Then, we examined the effect of adenoviral vector containing *tob* cDNA (Ad-*tob* vector) on cancer cell lines. The viral vector was expanded with transfection in 293 cells. The titer of the vector was  $350 \times 10^6$  pfu/ml. These cancer cells were able to be transfected with MOI 20 without adenoviral toxicity. The transfection of Ad-*tob* vector results in growth suppression of SOJ and AsPC-1 cell lines. The magnitude of the expression of the Ad-*tob* gene in cancer is correlated to tumor suppressive activity. We prepared pancreatic cancer peritonitis models using a peritoneal injection of AsPC-1 cells. In this model, bloody ascites and multiple tumor nodules were seen at the mesentery after 16 days. AdCA*tob* ( $50 \times 10^6$  pfu/day) was administered from day 5 to day 9 after 4 days of peritoneal injection of  $2 \times 10^6$  AsPC-1 cells. Tumor growth suppression occurred 10 days after peritoneal injection of AdCA*tob* compared with the control group. There were no tumor nodules in the abdomen and no bloody ascites. These results suggest that the peritoneal injection of AdCA*tob* has potential to suppress the formation of pancreatic cancer peritonitis, and can be applied for chemotherapy-resistant cancer peritonitis. © 2008 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

**Keywords:** *Tob* gene; Tumor suppressor gene; Adenovirus vector; Gene therapy

\* Corresponding author. Department of Cardiac Surgery, The University of Tokyo Hospital, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8655, Japan. Tel.: +81 3 5800 9194; fax: +81 3 5800 9195.

E-mail addresses: yanagie@n.t.u-tokyo.ac.jp, h.yanagie@gmail.com (H. Yanagie).

## 1. Introduction

Pancreatic cancer is one of the leading causes of cancer deaths in the world. Diagnosis of pancreatic cancer is difficult,

and once metastasis to the liver or peritoneal dissemination has occurred, current treatments, including surgery and chemotherapy, are difficult to induce complete remission [1].

Advances in science and technology for direct gene transfer into living animals have provided opportunities to develop treatment modalities of malignancies by somatic gene therapy [2–5].

TOB (transducer of ErbB-2) is a 45 kDa tumor suppressor that interacts with protein-tyrosine kinase receptors, including ErbB-2 [6,7]. ErbB-2 phosphorylates and interacts with Shc, which participates between active tyrosine protein kinases to the Ras signaling pathway. A point mutation or an elevated expression of ErbB-2 is commonly observed in pancreatic cancers and breast cancers. Matsuda et al. reported that the carboxy-terminal half of TOB is relevant to its interaction with ErbB-2 and the amino-terminal half is homologous to the growth suppressor protein BTG-1, and introduction of the *tob* gene into NIH3T3 cells results in cell growth suppression [6,8–10]. Expression of BTG-1 is high in quiescent cells and decreases when cells enter the growth cycle, suggesting that the gene product is inhibitory to G0/G1 progression. The *tob* is localized on chromosome 17q21, telomeric to the BRCA 1 locus.

Using the anti-proliferative function of TOB, here we evaluated *tob* expression in pancreatic cancer cell lines and discussed its potential as a useful candidate for genetic therapy of pancreatic cancer peritonitis with peritoneal (ip) injection of recombinant adenovirus vector containing the *tob* gene (AdCA*tob*) *in vitro* and *in vivo*.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Target tumor cells, mice and antibodies

The human pancreatic carcinoma cell line SOJ and AsPC-1 producing carcinoembryonic antigen (CEA), were maintained in RPMI1640 medium (Hazleton Biologics, Inc., Kansas, USA) supplemented with 10% fetal calf serum (Cell Culture Laboratories, Ohio, USA) and 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$  kanamycin. All cultures were incubated in high moisture air with 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C. The medium was changed three times a week.

Male BALB/*cnulnu* mice were obtained from Nihon SLC (Shizuoka, Japan) and used at 6–7 weeks of age. In each experiment, mice of similar age and weight were selected. Mice were housed in plastic cages and maintained in an air-conditioned room. The procedures for tumor implantation and sacrifice of the animals were in accordance with approved guidelines of the Institution's Animal Ethics Committee.

Mouse anti-human TOB monoclonal antibody (IgG 2a), 4B1, was obtained from Immuno-Biological Laboratories (Gunma, Japan).

### 2.2. Construction of plasmid

Expression plasmid pMIK-*tob* was constructed by inserting the 1.3 kbp *tob* cDNA fragment into pMIK vector (a derivative

of pME18S, kindly provided by Dr. K. Maruyama, DNAX Res. Inst., CA, USA) [6].

### 2.3. Northern blot analysis

Total RNA of cancer cells was extracted by the guanidium isothiocyanate method. RNA samples (10  $\mu\text{g}$ ) were separated and blotted following the general protocol. One kbp *Hind* III fragment of  $\lambda$  *tob* cDNA was used as a probe labeled with  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP [6].

### 2.4. Recombinant adenovirus preparation

Adenovirus vector containing the *tob* driven by CAG promoter (AdCA*tob*) was prepared in this study following the method described previously [11–13]. Briefly, the 1.2 kb human *tob* fragment was blunt ended and subcloned into downstream of the CAG promoter of adenovirus vector. This expression cassette was subcloned into the *Swa*I site of the pAdex1cw cosmid, resulting in pAdex1*tob*. The pAdex1cw is a 42 kb cosmid containing a 31 kb adenovirus type 5 genome lacking *E1A*, *E1B*, and *E3* genes, as described previously. The expression cosmid cassette and adenovirus DNA-terminal protein complex were cotransfected into 293 cells by calcium phosphate precipitation. The recombinant viruses were propagated with 293 cells and viral solution was stored at –80 °C. The titers of viral stocks were determined by plaque assay on 293 cells. Adenovirus containing the *lacZ* gene coding for the bacterial enzyme  $\beta$ -galactosidase (AdCA*lacZ*) was used as a control to measure the efficiency of tumor cell infection.

### 2.5. Adenovirus-mediated lac Z expression in vitro

The pancreatic cancer cell lines were plated at a density of  $50 \times 10^3$  cell/well in 24-well culture plates (Iwaki Glass, Tokyo, Japan) 12 h before AdCA*lacZ* infection. Then, culture medium was replaced with medium containing varying amounts of adenovirus per cell (MOI). After 48 h, the cells were stained with X-gal (Wako Ltd., Tokyo, Japan) and the number of  $\beta$ -galactosidase-positive cells was counted in order to demonstrate the transfection efficiency [13].

### 2.6. Cell growth assay

Human pancreatic cancer cell lines ( $50 \times 10^3$  cell) were cultured in 60 mm tissue culture dishes (Corning Glass Works, NY, U.S.A.) for 12 h. Then, the culture medium was replaced with suspensions of AdCA*lacZ* or AdCA*tob* at an MOI of 20. After transfection, the medium was changed every other day. Cell growth was assessed by counting the number of live cells on the indicated day after transfection. The results are the means  $\pm$  SD from three independent experiments.

### 2.7. Protein immunoblotting

Six days after transfection of AdCA*lacZ* or AdCA*tob* into the pancreatic cancer cell lines, total protein was isolated by

lysis in 0.5 ml 1% NP-40 (Sigma). The lysates (100 µg protein) were electrophoresed on a 10% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose (Nytran, Schleicher & Schuell, Keene, NH) [14]. Western analysis was performed with the anti-TOB monoclonal antibody using a second antibody conjugated to peroxidase. The preparations were visualized with diaminobenzidine.

## 2.8. In vivo tumor experiments

### 2.8.1. Establishment of tumors in nude mice

We prepared pancreatic cancer peritonitis models using intraperitoneal (ip) injection of AsPC-1 pancreatic cancer cells. AsPC-1 cells were trypsinized, washed once with RPMI1640 and suspended in RPMI1640 at 1, 2, 5 or  $10 \times 10^6$  cells/0.2 ml; a 0.2 ml cell suspension was injected into each nude mouse peritoneally.

### 2.8.2. Inhibition of tumor growth in vivo

In order to examine the tumor suppressor effect of the *tob* on the formation of pancreatic cancer peritonitis, ip injections of AdCA*tob* or AdCA*lacZ* were performed in tumor-bearing mice of a cancer peritonitis model. Peritoneal injection of AdCA*tob* or AdCA*lacZ* ( $50 \times 10^6$  pfu/0.2 ml/day, from day 5 to day 9) after 4 days of ip injection of AsPC-1 cells ( $2 \times 10^6$ , doubling time 2–3 days). After 16 days of tumor inoculation, the mice were sacrificed and tumor formations investigated in the abdominal cavity.

### 2.8.3. Pathological evaluation of tumors in nude mice

At 16 days of follow-up, tumors from AdCA*tob*-, AdCA*lacZ*-treated groups and the non-treated control group were evaluated for differences between the control and the experimental groups by analyzing the anti-TOB immunostained sections of each tumor. Formalin-fixed paraffin-embedded *in vivo* experimental tissues were cut at 4–5 µm, dried at 60 °C, deparaffinized, and hydrated with distilled water. Endogenous peroxidase activity was blocked with 3% hydrogen peroxidase in PBS, followed by rinsing in several changes of distilled water and PBS. Immunohistochemical studies were performed using the avidin–biotin–peroxidase complex method of Hsu et al. in the following manner: sections were blocked with normal rabbit serum for 30 min at room temperature and incubated with mouse anti-human TOB monoclonal antibody (clone 4B1, 1:100 dilution) for 30 min at room temperature. HISTOFINE SAB-PO (M) kit (Nichirei Co. Ltd., Tokyo, Japan) was used to apply biotinylated anti-mouse IgG/IgA/IgM and avidin–biotin–peroxidase complexes, incubating for 10 min at room temperature. The immunoperoxidase staining reaction was visualized by using 0.5% dimethyl-aminoazobenzene in 0.61 M Tris buffer (pH 7.4) containing 0.03% hydrogen peroxidase.

## 3. Results

### 3.1. Northern blot analysis of endogenous *tob* transcripts in pancreatic cancer cell lines

The endogenous *tob* mRNA was expressed in the three pancreatic cancer cell lines (Fig. 1). The level of *tob* mRNA of SOJ cells was low, but that of AsPC-1 cells was high (A). The overexpression of *c-erbB-2* mRNA was shown in BxPC-3 and AsPC-1 cells (B).

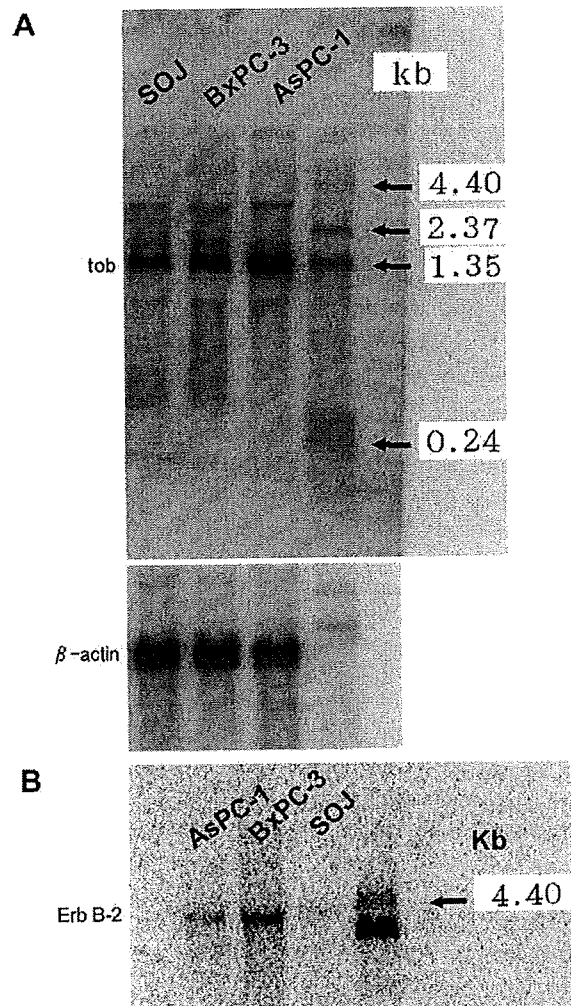


Fig. 1. Expressions of *tob*,  $\beta$ -actin (A) and *erbB-2* (B) mRNA in pancreatic cancer cell lines. Three human pancreatic cancer cell lines, AsPC-1, BxPC-3, and SOJ, were used in this experiment. (A) *tob* mRNAs are shown as a 1.3 kb band in the left side (upper panel of A). Total RNA was extracted and processed for Northern blot analysis as described in Section 2. A 10 µg of RNA were loaded in each lane. Standard molecular weights are shown on the right side as arrows. Internal control of the expression level of mRNA is shown as  $\beta$ -actin mRNA. (B) Expression level of *erbB-2* mRNAs is also compared among pancreatic cancer cell lines. Four kb bands corresponding to *erbB-2* mRNA are indicated by an arrow.

### 3.2. Adenovirus-directed lacZ gene transfer in pancreatic cancer cell lines in vitro

Use of a recombinant  $\beta$ -gal adenovirus AdCA $lacZ$  allowed us to establish the measures of gene transfer efficiency in pancreatic cancer cells. Three human pancreatic cancer cell lines, AsPC-1, BxPC-3, and SOJ were used as target cells for the vector. These cell lines were transfected with AdCA $lacZ$  at different MOIs (Fig. 2). The  $lacZ$  was expressed in all cell lines, in parallel with the increase in MOI. There was no significant difference in transfection efficacy among the cell lines, indicating that cell lines are susceptible to adenovirus transfection.

### 3.3. Tumor suppression by transfection of AdCA $tob$

In order to examine the tumor suppressor effect of the  $tob$  gene on the growth of cancer cells, the cells were transfected with AdCA $lacZ$  or AdCA $tob$  at an MOI of 20. The cells could be transfected with MOI 20 without adenoviral virulence. SOJ and AsPC-1 cell lines transfected with AdCA $tob$  vector showed growth suppression (Fig. 3A). SOJ and AsPC-1 cells expressed exogenous  $tob$  mRNA, and were enlarged and megakaryocytic with many granules in the cytoplasm (Fig. 3B). The characteristics resembled those of senescent cells. Anti-proliferative activity of TOB seems to be well correlated with the level of its expression. In comparison with AdCA $lacZ$ , the two-fold growth suppression was shown in the SOJ cell line expressing a good amount of TOB (Figs. 3A and 4).

### 3.4. Exogenous $tob$ expression

TOB expression was analyzed with Western blot analysis of lysates of pancreatic cancer cell lines after transfection of AdCA $lacZ$  or AdCA $tob$ . As shown in Fig. 4, an exogenous 45 kDa band was detected in all transfected cell lines. Tob was successfully introduced, especially into SOJ cells, and the magnitude of the expression of TOB is correlated to tumor growth suppressive activity, as shown in Fig. 3A.

### 3.5. Pathological findings of tumors treated with AdCA $tob$ vector: adenovirus-mediated $tob$ expression in vitro

Expression of exogenous TOB (45 kDa) was confirmed by immuno-cytostaining of cells. AsPC-1 cells were plated at a density of  $50 \times 10^3$  cells/well in a 24-well culture plate 12 h before AdCA $tob$  infection. Then, cells were transfected with AdCA $tob$  vector (MOI 20). After 72 h, cells were spun down and stained with anti-TOB monoclonal antibody 4B1 in order to determine the expression of TOB. AsPC-1 cells showed the expression of TOB with AdCA $tob$  transfection (Fig. 5).

### 3.6. Electronmicroscopic findings

We noted a dramatic change in the light scatter pattern of AsPC-1 cells upon induction of  $tob$  expression. Using transmission electron microscopy, we found that TOB-overexpressing AsPC-1 cells showed degradation of the nucleus and many autophagosomes and electron-dense cytoplasmic inclusions (Fig. 6A). The contents of these electron-dense cytoplasmic vesicles consisted of lamellar material that resembled lipofuscin, a lipid substance with auto-fluorescence properties that has been shown to accumulate with aging in the lysosomes of all vertebrates. Neither the increase inside scatter nor the appearance of lipofuscin granules was seen in AsPC-1 cells transfected with or without AdCA *mock* vector (Fig. 6B, C). Cytotoxic changes in TOB-induced AsPC-1 cells showed the degradation of autophagy.

### 3.7. Anti-tumorigenic effects of AdCA $tob$ vector on AsPC-1 cell-derived tumors in nude mice: morphological findings of tumors treated with AdCA $tob$ vector

Pancreatic cancer peritonitis model was established in nude mice using ip injection of AsPC-1 cells. Four days after the ip injection of AsPC-1 cells, the mice were ip-injected with AdCA $tob$  ( $50 \times 10^6$  or  $150 \times 10^6$  pfu/0.5 ml/day, from day 5 to day 9).

Bloody ascites and multiple tumor nodules were seen at the mesothelium after 16 days of ip injection of  $2, 5$  and  $10 \times 10^6$  AsPC-1 cells. We designed our initial experiments to determine whether *in vivo* AdCA $tob$ -mediated gene transfer would affect the formation of pancreatic cancer peritonitis after implantation of cancer cells into the abdominal cavity. Peritoneal injection of AdCA $tob$  suppressed tumor nodule formation in the abdominal cavity compared with the non-treated group (Fig. 7). Several tumor nodule formations were observed in AdCA $lacZ$ -treated mice. Bloody ascites was not seen in either AdCA $tob$  or AdCA $lacZ$ -treated mice (Table 1).

### 3.8. Pathological findings of tumor treated with AdCA $tob$ vector: adenovirus-mediated $tob$ expression in vivo

Only one tumor nodule was recognized in the abdominal cavity of AdCA $tob$  ( $50 \times 10^6$  pfu)-treated groups, and not found in that of  $150 \times 10^6$  pfu groups. The tumor continued to express TOB with staining by anti-TOB monoclonal antibody, 4B1 (Fig. 8A). On the other hand, the jejunum, mesothelium, acinar gland and pancreatic islets of Langerhans did not show the expression of exogenous TOB with AdCA $tob$  transfection (Fig. 8B). AsPC-1 cells expressing exogenous  $tob$  mRNA were enlarged and megakaryocytic with characteristics resembling those of senescent cells. These results suggest that our adenovirus-mediated  $tob$  gene therapy was applicable for the specific and efficient treatment of pancreatic cancer peritonitis.